槐尺蠖多酚氧化酶的纯化及酶学特征

刘春英[1]，罗万春[2]，李方正[3]，王晓云[1*]

(1. 山东农业大学生命科学学院，山东泰安 271018； 2. 山东农业大学农药毒理与应用技术省级重点实验室，山东泰安 271018； 3. 山东农业大学动物科技学院，山东泰安 271018)

摘要：经40%饱和度硫酸铵分级沉淀，Sephadex G-100凝胶过滤等步骤，将槐尺蠖 *Semiothisa cinerearia* Bremer *et* Grey 多酚氧化酶纯化，纯化倍数为6.96倍。该酶对焦性没食子酸，邻苯二酚和L-多巴的 K_m 值分别为0.23 mmol/L，0.48 mmol/L和0.49 mmol/L。多酚氧化酶在pH 7.0，37℃时活性最高，并在40℃以上条件下，随着保温时间的延长酶活力下降。用槲皮苷和硫脲作抑制剂对该酶活性的抑制结果表明，这两种抑制剂分别属于竞争性和非竞争性抑制剂。

关键词：槐尺蠖；多酚氧化酶；纯化；抑制剂；动力学特性

中图分类号：Q554 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2004)02-0184-05

Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Semiothisa cinerearia* Bremer *et* Grey (Lepidoptera: Geometridae)

LIU Chun-Ying[1], LUO Wan-Chun[2], LI Fang-Zheng[3], WANG Xiao-Yun[1*] (1. College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China; 2. Shandong Key Laboratory of Pesticide Toxicology and Application Technique, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China; 3. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China)

Abstract: The kinetic properties of polyphenol oxidase (PPO) from *Semiothisa cinerearia* Bremer *et* Grey, a forestry insect, were studied after the enzyme was partially purified by 40% saturated $(NH_4)_2SO_4$ and Sephadex G-100 gel filtration. The results showed that the 6.96-fold purification was achieved from the crude enzyme. The affinities of PPO with the substrates pyrogallol, catechol and L-dopamine (L-DOPA) were not different significantly, and the K_m with the three substrates was 0.23 mmol/L, 0.48 mmol/L and 0.49 mmol/L, respectively. The optimum pH was 7.0 and the best temperature was 37℃ for the tested PPO. The effects of two compounds as inhibitors of the reaction catalyzed by the enzyme were also tested. Those results indicated that quercetin could inhibit the PPO activity through competitive inhibition and thiourea could also inhibit the enzyme activity but through non-competitive reaction.

Key words: *Semiothisa cinerearia*; polyphenol oxidase; purification; inhibitor; kinetic properties

多酚氧化酶(polyphenol oxidase，简称PPO，在哺乳动物中也称为酪氨酸酶，EC1.14.18.1)是昆虫生命过程中的重要调节酶(李绍文等，1988)。多酚氧化酶催化完成的"醌鞣化"作用可以促进昆虫表皮的硬化与黑化，这个过程对具有"外骨骼"的昆虫生命过程至关重要。昆虫在其一生中有几次合成新表皮的过程，初生的新表皮是柔软的和色淡的，后来经过硬化和黑化过程才得以坚硬。张宗炳和冷欣夫(1993)总结国内外昆虫生理生化及昆虫毒理的研究结果后指出：探索新杀虫药剂的一条最有希望的途径是生物合理途径(biorational design)，其中"原酪氨酸酶抑制剂"和"鞣化过程抑制剂"被列在第一、二位。深入研究多酚氧化酶的生化特性，了解多酚氧化酶的作用机理，对发展作用机制独特的新型"环境友好"杀虫剂具有重要的理论及现实意义。槐尺蠖 *Semiothisa cinerearia* Bremer *et* Grey 是鳞翅目尺蛾科害虫，每年集中发生一代，其危害对象包括国槐、刺槐和龙爪槐(萧刚柔，1992)，在城市的街道绿化带和园林区常常暴发成灾，届时需喷洒大量杀虫剂才得以将其控制，但有毒的杀虫剂对环境会造成污染并

基金项目：国家自然科学基金项目(30270887)

作者简介：刘春英，女，1976年4月生，山东阳谷人，硕士研究生，生物化学与分子生物学专业，E-mail: ycliu2@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: xyunwang@sdau.edu.cn

收稿日期 Received: 2003-04-24；接受日期 Accepted: 2003-10-20

影响人类身体健康。我们对槐尺蠖的多酚氧化酶进行了初步纯化并研究了其动力学特性，旨在为开发以该酶为靶标的新型害虫抑制剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

槐尺蠖 5 龄幼虫采自山东农业大学校园行道树国槐树上，将其置于 - 20℃下保存备用。

1.2 方法

1.2.1 多酚氧化酶的提取与分离：取冰冻保存的槐尺蠖幼虫按 1 g∶10 mL 的比例加入预冷的 0.02 mol/L pH 7.0 的磷酸钠盐缓冲液（PBS）冰浴匀浆，8 000 r/min离心 10 min，于上清液中加入 40% 饱和度的硫酸铵，4℃下放置 30 min 后，10 000 r/min 离心 15 min。收集最后所得沉淀用相同的缓冲液溶解，并在相同缓冲液中透析 12 h，其间更换 2～4 次透析液，浓缩后经 Sephadex G-100 凝胶过滤，即得到初步纯化的槐尺蠖多酚氧化酶。

1.2.2 蛋白质浓度测定：采用考马斯亮蓝 G-250 法测定（Bradfold，1976），以牛血清蛋白（BSA）为标准蛋白。

1.2.3 酶活力测定方法：参照 Benjamin 和 Montgomery（1973）的方法并略有改进。1 mL 反应体系包括：50 μL 经 40%饱和度硫酸铵沉淀的酶液（以下测定酶活性的体系中酶液与此相同），0.02 mol/L pH 7.0 的 PBS，10 mmol/L 邻苯二酚，用岛津 UV-190 分光光度计检测 410 nm 下的吸光度。在上述条件下，以每分钟每毫克蛋白引起吸光值改变 0.001 为一个酶活力单位。

1.2.4 最适 pH 值测定：设定酶反应体系缓冲液的 pH 分别为 3.0，4.0，5.0，6.0，6.5，7.0，7.5，8.0，9.0 和 10.0；其中 pH 3.0，4.0 和 5.0 用醋酸盐缓冲液，pH 9.0 和 10.0 用甘氨酸-氢氧化钠缓冲液，其余用 PBS 缓冲液。以邻苯二酚为底物，测定不同 pH 缓冲液中的酶活性。

1.2.5 最适温度测定：将酶反应体系分别置于 25℃、33℃、37℃、43℃、50℃、60℃和 70℃水浴中 5 min，然后向反应体系中加入酶液，3 min 后取出，冰浴冷却 5 min 后，测定酶活力。

1.2.6 热稳定性测定：将酶液放置在 40℃、50℃、60℃和 70℃的恒温水浴中保温 15 min，每 3 min 测定一次酶活力。

1.2.7 底物专一性及米氏常数（K_m）值测定：与多酚氧化酶作用的底物分别为邻苯二酚（1.43～10 mmol/L），L-多巴（1～5 mmol/L）和焦性没食子酸（1.43～10 mmol/L），以上均用 0.02 mol/L pH 7.0 的 PBS 配制。按照酶活性测定方法分别在各自最适波长下测定多酚氧化酶的底物专一性及米氏常数（K_m）值。

2 结果与分析

2.1 酶的纯化

如表 1 所示，从槐尺蠖中提取的多酚氧化酶粗酶液经硫酸铵分级沉淀后，活力回收率为 85.61%，酶活力提高 5.58 倍。此结果表明用硫酸铵对槐尺蠖多酚氧化酶进行纯化可以取得较好效果。然而，经 Sephadex G-100 柱层析后，活力回收率却较低，仅为 4.70%，纯化倍数也较低，为 6.96 倍。此结果表明用 Sephadex G-100 进行柱层析对该酶的纯化效果不太理想。

表 1　槐尺蠖多酚氧化酶的部分纯化

Table 1　Partial purification of polyphenol oxidase from *Semiothisa cinerearia*

纯化步骤 Purification step	总体积（mL） Total volume	总蛋白（mg） Total protein	比活力（U/mg） Specific activity	总活力（U） Total activity	回收率（%） Recovery	纯化倍数 Purification
缓冲液提取液 Crude preparation	60	868.2	236.1	204 982	100	1.00
40%硫酸铵沉淀 40% $(NH_4)_2SO_4$	10	133.1	1 318.4	175 479	85.61	5.58
Sephadex G-100	5	5.9	1 643.5	9 696.7	4.70	6.96

2.2 酶的基本性质

2.2.1 最适 pH：以邻苯二酚为底物，测定槐尺蠖多酚氧化酶在不同 pH 值缓冲液中 2 min 内的吸光值变化，结果如图 1 所示。结果表明，pH 对酶活力有较强的影响。在酸性缓冲液中，酶活力随着 pH 值的升高而升高；但在碱性缓冲液中，酶活力则随着 pH 值的升高而降低。在 pH 7.0 时，酶活力达到最高值。

2.2.2 最适温度及多酚氧化酶热稳定性：槐尺蠖

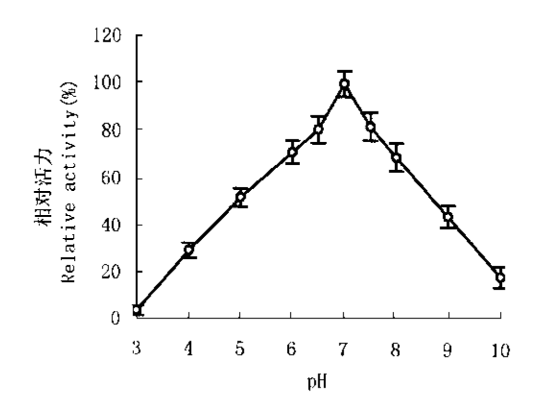


图1 pH值对槐尺蠖多酚氧化酶活力的影响

Fig. 1 Effect of pH on the activity of polyphenol oxidase from *Semiothisa cinerearia*

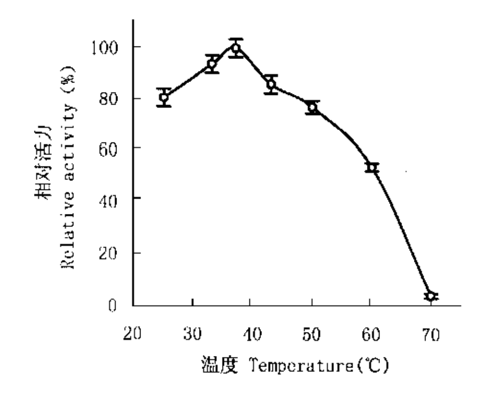


图2 温度对槐尺蠖多酚氧化酶活力的影响

Fig. 2 Effect of temperature on the activity of polyphenol oxidase from *Semiothisa cinerearia*

多酚氧化酶活性与温度的关系见图2。以邻苯二酚为底物，在25～37℃之间，酶活性随着温度的升高而增加，高于37℃时，酶活性则随着温度的升高而下降，其最适温度为37℃。另外，实验结果（图3）还表明，在每个设定的实验温度下，随着保温时间的延长，酶活力均呈下降趋势。如在40℃下保温15 min后，酶活力仅为原活力的63%；特别当温度升至60℃以上时，随着保温时间的延长，酶活力下降极为迅速；至70℃时保温9 min，酶趋于完全失活。

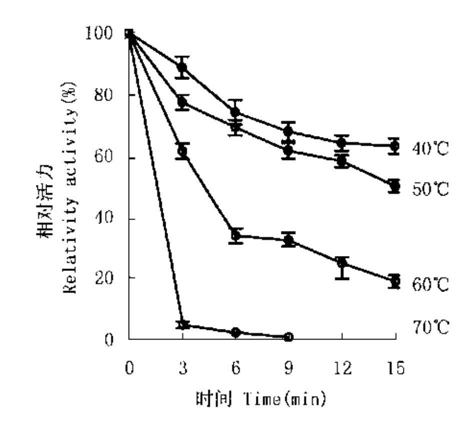


图3 温度对槐尺蠖多酚氧化酶稳定性的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the stability of polyphenol oxidase from *Semiothisa cinerearia*

2.2.3 多酚氧化酶底物专一性及 K_m 值：用槐尺蠖多酚氧化酶分别与焦性没食子酸、邻苯二酚和L-多巴反应，求出3种底物的 K_m、V_{max}（最大反应速度）和 V_{max}/K_m 值（此3个参数值均用Eadie-Hofstee作图法求出），如表2所示。

表2 槐尺蠖多酚氧化酶的底物专一性

Table 2 Substrate specificity of polyphenol oxidase from *Semiothisa cinerearia*

底物 Substrates	测定波长 λ(nm)	K_m(mean ± *SE*) (mmol/L)	V_{max}(mean ± *SE*) [ΔOD/(mg·min)]	V_{max}/K_m(mean ± *SE*) [ΔOD·L/(mmol·mg·min)]
焦性没食子酸 Pyrogallol	334	0.23 ± 0.05	0.16 ± 0.25	0.69 ± 0.15
邻苯二酚 Catechol	410	0.49 ± 0.06	0.21 ± 0.03	0.43 ± 0.05
L-多巴 L-DOPA	460	0.48 ± 0.02	0.17 ± 0.003	0.35 ± 0.03

实验重复3次，每次均重复制备酶液 Experiments were replicated three times and new enzyme was prepared every time.

在槐尺蠖多酚氧化酶与3种底物的反应中，与焦性没食子酸作用的 K_m 值略低，为0.23 mmol/L，其次为L-多巴和邻苯二酚，分别为0.48 mmol/L和0.49 mmol/L。此结果表明，在实验所用的3种底物中，槐尺蠖多酚氧化酶对焦性没食子酸、L-多巴和邻苯二酚的亲和力差异不大。

2.3 抑制剂对槐尺蠖多酚氧化酶的影响

2.3.1 槲皮苷对槐尺蠖多酚氧化酶的影响：以L-DOPA为底物，在不同的底物浓度下，做5种不同浓度槲皮苷的抑制实验，用双倒数作图法（Lineweaver-Burk作图），绘得该化合物抑制槐尺蠖多酚氧化酶的双倒数图（图4）。从图4可以看出，无论有无抑制剂存在，5条曲线都是直线，且交于纵轴上的同一点，即 V_{max} 值都是相同的。同时从图4还可以看出，K_m 值与抑制剂的存在与否有关。抑制剂浓度为0（即无抑制剂存在）时，K_m 最小，即酶与底物的亲和

力最大;有抑制剂存在时,K_m 随着抑制剂浓度的增加而增大。因此,在槐尺蠖多酚氧化酶催化多巴的褐变反应中,槲皮苷只改变 K_m,不改变最大反应速度,说明槲皮苷是典型的竞争性抑制剂,即底物(L-多巴)和抑制剂(槲皮苷)与槐尺蠖多酚氧化酶络合时是在酶的相同部位结合的。

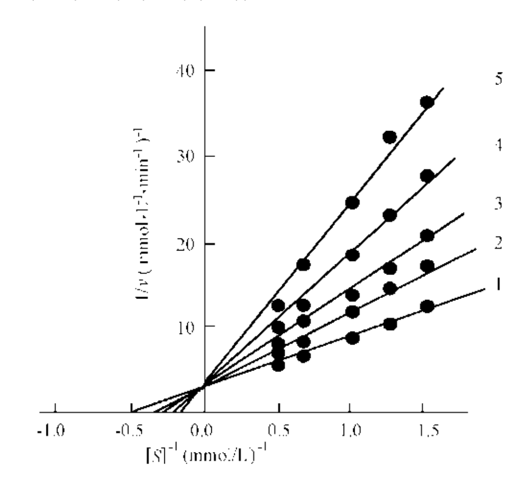


图 4　用 L-多巴作底物时不同浓度的槲皮苷对多酚氧化酶的竞争性抑制

Fig. 4　Competitive inhibition of PPO by different concentrations of quercetin with L-DOPA as substrate

1,2,3,4 和 5 分别代表 0,20,40,60 和 80 μmol/L 槲皮苷。

Curves 1,2,3,4 and 5 represented 0,20,40,60 and 80 μmol/L quercetin respectively.

2.3.2　硫脲对槐尺蠖多酚氧化酶的影响:以邻苯二酚为底物,在不同底物浓度下,做 5 种不同浓度硫脲的抑制实验,用双倒数作图法(Lineweaver-Burk 作图),绘得该化合物对槐尺蠖多酚氧化酶活性的双倒数图(图 5)。

由图 5 结果可以看出,无论有无抑制剂存在,5 条曲线都是直线,且相交于纵轴左边横轴上的同一点,即 K_m 值都是相同的。从图 5 还可以看出,反应速度随着抑制剂浓度的增加而降低。因此,在槐尺蠖多酚氧化酶催化氧化邻苯二酚的褐变反应中,硫脲只改变反应速度,不改变米氏常数,说明硫脲是典型的非竞争性抑制剂,即底物(邻苯二酚)和抑制剂(硫脲)与槐尺蠖多酚氧化酶络合时是在酶的不同部位结合的。

3　讨论

本研究采用 40% 饱和度的硫酸铵沉淀,Sephadex G-100 凝胶过滤层析对槐尺蠖多酚氧化酶进行纯化,经两步纯化后,多酚氧化酶活力提高了

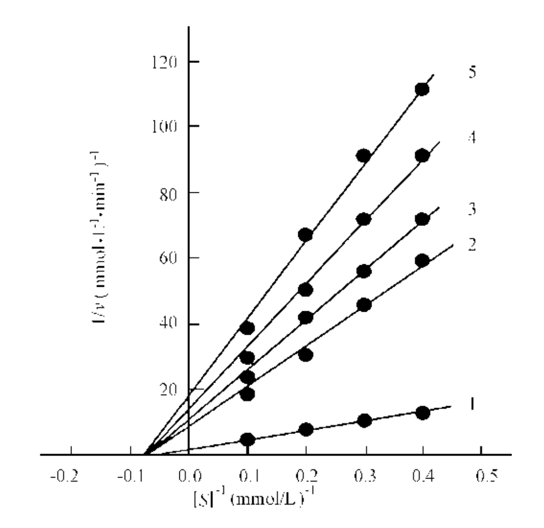


图 5　用邻苯二酚作底物时不同浓度的硫脲对多酚氧化酶的非竞争性抑制

Fig. 5　Non-competitive inhibition of PPO by different concentrations of thiourea with catechol as substrate

1,2,3,4 和 5 分别代表 0,0.2,0.3,0.4 和 0.5 μmol/L 硫脲。

Curves 1,2,3,4 and 5 represented 0,0.2,0.3,0.4 and 0.5 μmol/L thiourea respectively.

6.96 倍。Jiang 和 Fu(1998)采用类似的凝胶过滤层析法纯化梨多酚氧化酶,使多酚氧化酶活力提高了 11.6 倍。目前,在国内有关昆虫多酚氧化酶纯化的报道极少,程振衡和梁子才(1990)采用凝胶过滤层析对亚洲玉米螟血淋巴中的多酚氧化酶进行纯化,比活力最高部分比血浆提高了 56 倍。郑校先等(2001)采用 30% ~ 80% 硫酸铵沉淀、DEAE-Sepharose CL-6B 离子交换层析和 Sephadex G-150 凝胶过滤层析,使纯化倍数提高了 10.78 倍,并得到单一电泳条带。Yamaura 等(1980)用硫酸铵沉淀和羟基磷灰石柱层析法纯化家蝇幼虫多酚氧化酶,纯化了 21.5 倍,然后又经两步 Sephadex G-200 凝胶过滤层析,纯化倍数提高到 437.5 倍,也得到单一电泳条带。与前人的实验结果相比,若得到单一电泳纯的槐尺蠖多酚氧化酶还需进一步纯化。多酚氧化酶的纯化是其性质研究的基础,并对开展昆虫毒理学、研究多酚氧化酶抑制剂理论以及害虫抗性,特别是多酚氧化酶靶标抗性具有促进作用。因此,有必要加强对不同来源多酚氧化酶分离和纯化的进一步探讨。

本研究结果表明,槐尺蠖多酚氧化酶的最适 pH 值为 7.0,这与一些植物果实来源,如杏(田程瑞等,1997)、牛蒡(乔旭光等,1997)和香蕉(Yang *et al*.,2000)的多酚氧化酶的最适 pH 值基本一致。研究结果还表明,与植物来源的多酚氧化酶(Yang *et al*.,2000)相比,槐尺蠖多酚氧化酶的热稳定性较差,

70℃时保温 9 min,酶趋于完全失活。在本实验中,我们选择了 3 种多元酚作为底物研究槐尺蠖多酚氧化酶的底物专一性。结果表明,槐尺蠖多酚氧化酶对焦性没食子酸、L-多巴和邻苯二酚的亲和力差异不大。这与文献报道的白对虾、肥城桃 *Prunus persica* 来源的多酚氧化酶对 L-多巴的亲和力高于邻苯二酚(Chen *et al*.,1991;冯炘和周宏伟,1996)有差异。

本研究采用槲皮苷和硫脲两种化合物,研究其对多酚氧化酶的抑制作用。结果表明,以 L-多巴为底物,槲皮苷是槐尺蠖多酚氧化酶的竞争性抑制剂。其抑制机制可能在于槲皮苷与底物结构类似,两者同时竞争酶的活性中心。当槲皮苷达到一定浓度时,槲皮苷与酶结合形成无活性的二元复合物 EI,使酶不能再与底物结合催化产物的形成。前人研究表明,多酚氧化酶是一种含铜离子的金属酶,其分子中含有一个双铜核位点作为反应中心(Shahar *et al*.,1992),Lerch(1981)描述了脉孢菌属 *Neurospora* 多酚氧化酶中双铜核位点的特性。研究报道多酚氧化酶中铜是以 2 价离子对的形式存在,离子间距为 3.6×10^{-3} cm,酚上两个氧基与铜离子对上的两个铜分别键合,因此铜离子对起活化作用。本实验结果表明,与槲皮苷不同,硫脲对多酚氧化酶的抑制属于非竞争性抑制。探讨其抑制机制,我们认为硫脲的抑制机制与苯甲酸钠相似(曾伟成和郑能武,2000)。苯甲酸钠中 $>C=O$ 可与铜离子对上的铜键合,起抑制作用。S 与 O 是同族元素,所以硫脲(H_2NCSNH_2)中的 $>C=S$ 与苯甲酸钠的 $>C=O$ 类似,$>C=O$ 也竞争内源桥基的结合位点。在这种情况下,硫脲既可以与游离酶结合形成 EI,也可与酶和底物的复合物 ES 作用生成 EIS。除了 ES 能分解生成产物外,EIS 也能分解生成产物,但二者分解生成产物的速度不一样,也就是说,硫脲虽然能取代内源桥基而使酶继续发挥催化功能,但硫脲所形成的内源桥基显然不如天然的内源桥基效率高,这也就是硫脲是多酚氧化酶的非竞争性抑制剂的可能原因。

参 考 文 献(References)

Benjamin ND, Montgomery MW, 1973. Polyphenol oxidase of royal ann cherries: purification and characterization. *J. Food Sci*., 38: 799 – 806.

Bradfold MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*., 72: 248 – 254.

Chen JS, Wei C, Rolle RS, Otwell WS, Balaban MO, Marshall MR, 1991. Inhibitory effect of kojic acid on some plant and crustacean polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem*., 39 (8): 1 396 – 1 401.

Cheng ZH, Liang ZC, 1990. Studies on the phenoloxidase in the hemolymph of the Asian comborer *Ostrinia furnacalis*. *Acta Entomol. Sin*., 33 (4): 424 – 429. [程振衡,梁子才,1990. 亚洲玉米螟血淋巴中酚氧化酶的研究. 昆虫学报, 33 (4): 424 – 429]

Feng X, Zhou HW, 1996. Partial purification and characteristics of polyphenol oxidase from *Prunus persica* L. (Feicheng Peach). *Journal of Shandong Agricultural University*, 27 (1): 87 – 92. [冯炘, 周宏伟, 1996. 肥城桃多酚氧化酶的部分纯化及其特性. 山东农业大学学报, 27 (1): 87 – 92]

Jiang YM, Fu JR, 1998. Inhibition of polyphenol oxidase and the browning control of litchi fruit by glutathione and citric acid. *Food Chemistry*, 62 (1): 49 – 52.

Lerch K, 1981. Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine β-monooxygenase. In: Sigel H ed. Metal Ions in Biological Systems. New York: Dekker. 143 – 186.

Li SW, Wang MS, Zeng YH (Translated), 1988. Biochemistry of Insect. Beijing: Science Press. 151 – 156. [李绍文,王孟淑,曾耀辉(译), 1988. 昆虫生物化学. 北京: 科学出版社. 151 – 156]

Qiao XG, Xia XD, Zhang BZ, Li H, 1997. Study on the kinetic characteristics of polyphenol oxidase in burdock (*Arctium lappa* L.). *Journal of Shandong Agricultural University*, 28(3): 327 – 330. [乔旭光, 夏向东, 张步志, 李辉, 1997. 牛蒡多酚氧化酶酶学性质的研究. 山东农业大学学报, 28(3): 327 – 330]

Shahar T, Hennig N, Gutfinger T, Hareven D, Lifschitz E, 1992. The tomato 66.3 kDa polyphenoloxidase gene: molecular identification and developmental expression. *Plant Cell*, 4: 135 – 147.

Tian CR, Zhang JF, Chen JP, Wang YR, 1997. Studies on dynamics of apricot polyphenoloxidase. *Acta Agriculturae Boreali-occidentails Sinica*, 6(3): 78 – 81. [田呈瑞, 张京芳, 陈锦屏, 王银瑞, 1997. 杏多酚氧化酶动力学研究. 西北农业学报, 6(3): 78 – 81]

Xiao GR, 1992. Forest Insects of China. 2nd ed. Beijing: China Forestry Publishing House. 922 – 923. [萧刚柔, 1992. 中国森林昆虫. 第二版. 北京: 中国林业出版社. 922 – 923]

Yamaura I, Yonekura M, Katsura Y, Ishiguro M, Funatsu M, 1980. Purification and some physico-chemical properties of phenoloxidase from the larvae of housefly. *Agric. Biol. Chem*., 44 (1): 55 – 59.

Yang CP, Fujita S, Ashrafuzzaman MD, Nakamura N, Hayashi N, 2000. Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. *J. Agric. Food Chem*., 48: 2 732 – 2 735.

Zeng WC, Zheng NW, 2000. The inhibitory effect of tyrosinase by sodium benzoate. *Journal of Mathematical Medicine*, 13 (2): 161. [曾伟成, 郑能武, 2000. 苯甲酸钠对酪氨酸酶的抑制作用. 数理医药杂志, 13 (2): 161]

Zhang ZB, Leng XF, 1993. Pesticide Toxicology and Application. Beijing: Chemical Industry Press. 331 – 337. [张宗炳, 冷欣夫, 1993. 杀虫药剂毒理及应用. 北京: 化学工业出版社. 331 – 337]

Zheng XX, Qi X Y, Zhou PG, Jiang JJ, 2001. Purification of polyphenol oxidase from cuttlefish ink. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 10 (2): 154 – 157. [郑校先, 戚晓玉, 周培根, 江津津, 2001. 乌贼墨中多酚氧化酶的分离及纯化. 上海水产大学学报, 10 (2): 154 – 157]

(责任编辑: 黄玲巧)